Le Infezioni in Medicina, n. 2, 117-124, 2013

Articolo originale

Original article

Attività *in vitro* degli oli essenziali di *Eucalyptus smithii* e *Juniperus communis* su *biofilms* batterici e prospettive di efficacia nella terapia complementare inalatoria delle infezioni croniche e recidivanti delle via aeree superiori

In vitro activity of Eucalyptus smithii and Juniperus communis essential oils against bacterial biofilms and efficacy perspectives of complementary inhalation therapy in chronic and recurrent upper respiratory tract infections

Alessandro Camporese
S.O.C. di Microbiologia Clinica e Virologia, A.O. S. Maria degli Angeli, Pordenone, Italy

INTRODUZIONE

Le infezioni batteriche causate da popolazioni microbiche opportuniste, caratterizzate da modesta virulenza intrinseca, rappresentano oggi una frazione dominante della patologia infettiva, e sono causate da meccanismi patogenetici spesso molto diversi rispetto a quelli che accompagnano le patologie riferibili a forme batteriche planctoniche. Queste comunità batteriche, infatti, si ritrovano nelle lesioni sotto forma sessile, aderenti a superfici e organizzate in *biofilms* [1]. Le infezioni rispondenti a questo modello includono la carie dentale, le periodontiti, le colecistiti, le osteomieliti, la prostatite, le endocarditi, l'otite media, la sinusite, la fibrosi cistica e le esacerbazioni delle bronchiti croniche [2-5]. Escludendo gli ecosistemi naturali, in campo clinico estese colonizzazioni di patogeni opportunisti possono altresì rilevarsi sulle protesi valvolari cardiache, su cateteri venosi centrali, cateteri urinari, lenti a contatto, *device* intrauterini e protesi ortopediche [2, 6]. Il *biofilm* è definito come una comunità di batteri inclusa in una matrice di polimeri organici (*slime* o glicocalice) che aderisce a una superficie [7]. La cinetica di formazione del *biofilm* inizia con l'adesione irreversibile di una cellula planctonica a una superficie, indipendentemente dalla natura di quest'ultima. Una volta avvenuta l'adesione tramite specifici ligandi, i batteri si moltiplicano formando microcolonie. In seguito all'espressione di particolari siti genici, attivati a seguito di determinate condizioni, e all'instaurarsi di fitte comunicazioni intercellulari definite come *quorum sensing*, queste popolazioni microbiche iniziano a sintetizzare e a produrre un'abbondante matrice polisaccaridica chimicamente variabile e complessa, definita *slime*, che finisce per inglobare tutti gli ele-

*Corresponding author
Alessandro Camporese
E-mail: alessandro.camporese@aopn.fvg.it

menti presenti [7]. Lo *slime* interagisce con i fluidi che circolano nell'ambiente, contribuendo a completare la fitta organizzazione e la maturazione del *biofilm*. In tale struttura le cellule sessili hanno accesso limitato alle fonti energetiche e difficoltà all'eliminazione delle scorie cataboliche, mentre risultano subottimali anche i livelli di perfusione di ossigeno, osmolarità e concentrazione idrogenionica. Raggiunta una massa critica si stabilisce un equilibrio dinamico e, forse per intervento di specifici enzimi che idrolizzano parte dello *slime*, dalla superficie del *biofilm* si generano ondate successive di cellule planctoniche in grado di colonizzare altri siti anche a distanza, mentre i microrganismi degli strati più interni divengono metabolicamente quiescenti cessando di replicarsi. Questi aspetti fondamentali della fisiologia del *biofilm* maturo rendono ragione della diversa cinetica che possono esplicare gli antibiotici su organismi sessili, piuttosto che planctonici. Per citare qualche esempio, la ridotta attività di moltiplicazione rende quasi inefficaci i farmaci che agiscono sulla parete batterica, quali i beta-lattamici e i glicopeptidi, mentre la bassa tensione di ossigeno, l'ambiente acido e l'accumulo di cationi riducono l'effetto di aminoglicosidi e fluorochinoloni [6, 8-10]. Analoga influenza negativa subiscono gli elementi delle difese immunologiche dell'organismo, mentre al tempo stesso la struttura intrinseca del biofilm contribuisce a perpetuare la presentazione dell'antigene e a rendere cronico il processo infiammatorio determinatosi nell'area interessata dal processo [11, 12]. Le peculiari caratteristiche dei *biofilms* giustificano, perciò, buona parte delle difficoltà che si incontrano nella terapia delle infezioni che li vedono protagonisti, per lo più caratterizzate dalla persistenza, dalla cronicità e dalle continue esacerbazioni, come spesso si rileva nelle infezioni croniche e/o recidivanti delle vie respiratorie, soprattutto di pertinenza otorinolaringoiatrica. L'efficacia dell'azione delle difese naturali e degli antibiotici, infatti, è in grado di esplicarsi solo sulla componente planctonica. La riduzione numerica di questa frazione della popolazione porta, perciò, alla momentanea scomparsa della sintomatologia e all'apparente remissione del quadro clinico, mentre il *biofilm* non viene in alcun modo eradicato e, salvo possibilità di rimozione chirurgica, permane come *focus* locale destinato a perpetuare la malattia e a generare le ricadute [13]. Da queste premesse appare, quindi, evidente il motivo per cui l'interesse della comunità scientifica si è indirizzato verso la ricerca di molecole capaci di inibire sia la formazione di *biofilms* che, ancora più significativamente, di provocare la dissoluzione delle strutture già consolidate. I primi studi condotti negli anni '80 hanno dimostrato che la produzione di *slime* e la conseguente organizzazione di *biofilms* può essere ridotta sia da certe molecole antiinfiammatorie che da alcuni farmaci antibatterici mentre, più recentemente, si è potuta rilevare una interessante attività anti-*biofilm* anche di altre molecole prive di specifica attività antibatterica [14-16]. In relazione a queste premesse, e in considerazione delle ormai scarse risorse terapeutiche antimicrobiche di sintesi a disposizione, dell'ormai inesorabile aumento delle resistenze batteriche e della maggiore probabilità di selezionare ecosistemi microbici resistenti ai farmaci nei contesti clinici sostenuti da *biofilms*, soprattutto a seguito di ripetuti, quanto inefficaci trattamenti, si è inteso valutare il comportamento di due oli essenziali (*Eucalyptus smithii* e *Juniperus communis*), entrambi supportati da una consistente tradizione fitoterapica e caratterizzati da specifiche componenti chimiche che presentano uno spiccato tropismo terapeutico nei confronti dell'apparato respiratorio, con lo scopo di individuarne la potenziale azione sulla formazione e sulla degradazione di *biofilms* [17-19]. Tale ipotesi, suffragata dalle caratteristiche dei chemiotipi dei due fitoderivati testati, intende valutare un possibile contributo complementare e naturale, in grado di intervenire migliorando l'efficacia dei presidi di sintesi utilizzati nella terapia delle infezioni croniche e/o recidivanti delle prime vie respiratorie, soprattutto di pertinenza otorinolaringoiatrica, quali ad esempio l'otite media e la sinusite cronica, che più spesso sono sostenute da *biofilm*.

MATERIALI E METODI

I due oli essenziali (oo.ee.), caratterizzati chimicamente secondo quanto previsto dalla Farmacopea Europea, sono stati testati sperimentalmente su 4 ceppi batterici, analizzando la loro capacità di ridurre la formazione di *biofilms*, e parallelamente la capacità di disgregare *biofilms* già consolidati [20]. La capacità di sintesi dello *slime* da parte dei ceppi batterici testati è stata evidenziata utilizzando il metodo che utilizza il terreno Rosso Congo, ampia-

mente descritto in letteratura [21-23]. Brevemente, dopo incubazione di 24 ore a 37°C in aerobiosi, le colonie batteriche colorate in nero sono state considerate come *strong slime producers*, mentre quelle di colore marrone sono state considerate come *normal slime producers* (24, 25). Sono stati testati 4 ceppi batterici, di cui due di isolamento clinico (*Staphylococcus aureus* (SA) meticillino resistente (MRSA), n=1; *Pseudomonas aeruginosa* (PSA), n=1), ottenuti da pazienti affetti da sinusite cronica, entrambi rivelatisi *strong slime producers* dall'analisi di *screening* con Rosso Congo. Contestualmente, i due oli essenziali sono stati testati anche su due ceppi ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), entrambi rivelatisi *normal slime producers*. La scelta dei microrganismi da testare è caduta, non a caso, su due specie batteriche che spesso caratterizzano da un punto di vista eziologico i processi infiammatori cronici e/o ricorrenti a carico delle prime vie respiratorie (soprattutto otiti medie e rinosinusiti), rappresentando al tempo stesso dei modelli ottimali per lo studio dei *biofilms*, e purtroppo altresì un ottimo esempio di evoluzione dei meccanismi di resistenza che hanno ridotto ormai drasticamente l'armamentario terapeutico di sintesi a disposizione. Gli oo.ee. scelti per la sperimentazione, con caratteristiche riferibili a quanto previsto dalla Farmacopea Europea, sono stati selezionati sulla base di consistenti elementi della tradizione fitoterapica e della letteratura specifica, che ne enfatizzano da sempre le ottime capacità mucolitiche ed espettoranti, quando utilizzati per via inalatoria. La composizione chimica, definita mediante gascromatografia, dell'olio essenziale estrattto da foglie di *Eucalyptus smithii* (ES) era caratterizzata, come previsto in Farmacopea, dalla presenza di una componente in 1.8 cineolo pari al 66,2% (*range*: 50-70%). L'olio essenziale estratto da rametti e frutti di *Juniperus communis* (JC) presentava, invece, come previsto in Farmacopea, una percentuale di alfa-pinene pari a 35,4% (*range*: 20-50), beta-pinene pari a 2,3% (*range*: 1-12), beta mircene pari a 4,7% (*range*: 1-35), limonene pari a 4,1% (*range*: 2-12), sabinene pari a 19,1% (*range*: <20). Le analogie funzionali di questi due oli essenziali con l'attività farmacologica di alcune molecole di sintesi attualmente disponibili sul mercato, quali ad esempio la N-acetilcisteina, ci hanno indotto a sfruttare le indicazioni di analoghe precedenti esperienze sperimentali, già utilizzate per valutare l'efficacia *in vitro* di altri agenti mucolitici sui *biofilms* batterici [16]. Gli effetti dei due oo.ee. sulla produzione di *biofilms* sono stati valutati sui 2 ceppi di SA e sui 2 ceppi di PSA precedentemente descritti. I due oo.ee. commerciali di ES (codice di prodotto HES20041, lotto R769190-8, provenienza Sudafrica) e di JC (codice di prodotto HES20053, lotto R889488-14, provenienza Francia) sono stati forniti dalla Ditta Florisco (Terranuova Bracciolini, Arezzo, Italia), e sono stati analizzati utilizzando concentrazioni compatibili con quelle comunemente raggiungibili *in vivo* nel tratto respiratorio, utilizzando la via inalatoria mediante aerosol, ovvero da 5 µl/mL (0,5%) a 20 µl/mL (2%). La formazione di *biofilm* è stata quantificata spettrofotometricamente in micropiastre di polistirene con fondo a U (Kima, Padova, Italia), modificando il metodo descritto da Cramton et al., e come descritto precedentemente anche da altri Autori [16, 26]. Più in dettaglio, l'effetto di ES e JC sulla formazione di *biofilm* è stata valutata come segue: brodocolture in fase stazionaria in Tryptic Soy Broth (TSB), addizionato con glucosio (0,25%) (TSBG) sono state diluite 1:100 in TSBG. Aliquote di 100 µl di queste sospensioni sono state aggiunte a concentrazioni di ES e JC variabili a raddoppio, da 5 µl/mL a 20 µl/mL. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, le micropiastre sono state lavate tre volte con tampone fosfato 10 mM pH 7,4 (PBS), trattate con fissativo di Bouin, e quindi colorate con Cristal Violetto (0,01%). Il *biofilm* adeso alle pareti delle micropiastre è stato lavato con PBS, sospeso in sarcosile al 10% e misurato spettrofotometricamente a 492 nm. La stessa metodica è stata impiegata per calcolare la quantità residua di *biofilm* dopo trattamento rispettivamente con ES e JC. A tale scopo, *biofilm* pienamente consolidato (dopo 48 ore) è stato esposto a concentrazioni di ES e JC variabili da 0,5 mg/mL a 20 mg/mL.

RISULTATI

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportati i risultati delle analisi condotte testando l'attività *in vitro* dei due oo.ee. nei confronti dei *biofilms* prodotti dai 4 ceppi batterici selezionati.
Come si evince dai risultati, sia l'olio essenziale di ES, che quello di JC, con le caratteristiche chimiche testate, hanno rivelato una significativa attività sia nell'inibire la formazione di *biofilm*, sia nel degradare i *biofilms* già consoli-

Tabella 1 - Risultati dell'attività di inibizione (espressa in %) di *Eucalyptus smithii* e di *Juniperus communis* sui biofilms indotti da 2 diversi ceppi di *Staphylococcus aureus* e 2 diversi ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*.

Ceppi batterici		*Attività di inibizione (%) dei due oo.ee. alle diverse concentrazioni testate*					
		E. smithii 5 microl/mL	*E. smithii 10 microl/mL*	*E. smithii 20 microl/mL*	*J. communis 5 microl/mL*	*J. communis 10 microl/mL*	*J. communis 20 microl/mL*
Ceppi selvaggi	MRSA	28,6	47,2	85,6	21,4	39,2	79,8
	P. aeruginosa	24,3	40,8	76,2	17,5	33,6	68,4
Ceppi ATCC	*S. aureus* ATCC	43,3	68,2	93,1	35,4	58,1	87,3
	P. aeruginosa ATCC	38,1	59,6	88,5	33,4	47,2	79,2

dati. L'attività, espressa in percentuale diversa, si è manifestata alle diverse concentrazioni tradizionalmente utilizzate per via aerosol. Tale attività è risultata significativa sia sui due ceppi selvaggi, ottenuti da isolamento clinico, sia sui due ceppi ATCC, anche se in percentuali diverse, come peraltro atteso.

Inibizione della formazione di biofilm

Come è evidente dai dati della Tabella 1, l'attività di inibizione della formazione di *biofilm* alla massima concentrazione di ES (20 microl/mL) ha raggiunto il 93,1% sul ceppo di SA ATCC, e l'85,6% sul ceppo selvaggio di MRSA, mentre ha raggiunto rispettivamente l'88,5% e il 76,2% rispettivamente sul ceppo di PSA ATCC e su quello selvaggio ottenuto da isolamento clinico. L'azione di inibizione si è poi ridotta proporzionalmente con l'utilizzo di diluizioni maggiori (10 e 5 microl/mL), sempre mantenendo però una consistente efficacia.
Nella Tabella 1 è riportata, altresì, l'azione di JC, che si è manifestata in percentuale lievemente inferiore rispetto a quella di ES.

Degradazione di biofilm già consolidato

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti dalla valutazione in percentuale della capacità di ES e di JC di degradare *biofilms* già consolidati dopo 48 ore. Anche in questo fondamentale ruolo, che ha rilevanti risvolti terapeutici, i due oo.ee. hanno espresso percentuali di attività molto significative alle diluizioni testate, con una maggiore azione ottenuta anche in questo caso da parte di ES, ma con una percentuale di degradazione media, calcolata sui dati di attività misurata cumulativamente su Gram-positivi e Gram-negativi, che per entrambi gli oo.ee. va ben oltre il 60%.
Un risultato che ha un potenziale risvolto clinico non trascurabile nella terapia e prevenzione delle patologie croniche batteriche da *biofilms*, soprattutto nei distretti di pertinenza otorinolaringoiatrica (otiti medie, sinusiti), facilmente raggiungibili per via aerosol alle concentrazioni testate.

CONCLUSIONI

Il fallimento della terapia antibiotica nelle più comuni patologie recidivanti, ricorrenti e croniche dell'albero respiratorio, e in particolare delle strutture anatomiche di pertinenza otori-

Tabella 2 - Risultati dell'attività di degradazione (espressa in %) di *Eucalyptus smithii* e di *Juniperus communis* sui *biofilms* consolidati dopo 48 ore, prodotti da 2 diversi ceppi di *Staphylococcus aureus* e 2 diversi ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*.

Ceppi batterici		*Attività di degradazione (%) dei due oo.ee. alle diverse concentrazioni testate*					
		E. smithii 5 microl/mL	*E. smithii 10 microl/mL*	*E. smithii 20 microl/mL*	*J. communis 5 microl/mL*	*J. communis 10 microl/mL*	*J. communis 20 microl/mL*
Ceppi selvaggi	MRSA	56,2	65,6	74,2	54,1	61,8	71,7
	P. aeruginosa	53,1	60,1	69,9	51,8	57,4	66,8
Ceppi ATCC	*S. aureus* ATCC	61,9	72,8	81,8	59,3	70,2	79,5
	P. aeruginosa ATCC	58,4	68,3	78,2	55,6	66,2	75,8

nolaringojatrica (ORL), può essere ascritto a un complesso di fattori pertinenti all'ospite, all'ambiente, ai microrganismi o alla terapia farmacologica. Tra le motivazioni della refrattarietà delle patologie infettive merita un posto di crescente rilievo il fenomeno della formazione di *biofilms* batterici, complesse organizzazioni tridimensionali che rappresentano una modalità di crescita protetta, che rende i batteri altamente resistenti ai meccanismi di difesa messi in atto dall'organismo umano così come ai trattamenti antibiotici, rappresentando altresì un microambiente molto dinamico nel quale avvengono scambi di molecole enzimatiche, proteiche, ma anche di materiale genetico [1]. In considerazione della rilevanza clinica della sintesi di *biofilms* da parte di numerosi patogeni batterici in infezioni croniche non solo di pertinenza ORL, che spaziano dalla fibrosi cistica alle osteomieliti, alle endocarditi alle esacerbazioni delle broncopneumopatie, a partire dagli anni '80 numerosi studi hanno valutato l'attività di diverse molecole, non sempre con specifica attività antibatterica, sulla produzione di glicocalice e sulla vitalità degli elementi cellulari che costituiscono il *biofilm* [16, 27-30].

Gli antibiotici possono, infatti, influenzare i meccanismi di adesività e produzione di *slime* in diversi modi, ma il comportamento di questi farmaci risulta spesso molto variabile in funzione della loro effettiva capacità di penetrazione nella struttura del *biofilm*. É stato, invece, dimostrato che anche molecole non dotate di per sé di attività antimicrobica specifica, hanno la capacità di disgregare o di inibire la sintesi di *biofilms* [31-33]. L'attività di N-acetilcisteina (NAC), ad esempio, di cui è ampiamente conosciuta l'efficacia mucolitica, con un altrettanto riconosciuto potere antiossidante, è stata ampiamente studiata in funzione di inibizione della formazione di *biofilms*. Essa ha dimostrato di essere in grado di interferire nelle diverse fasi di formazione di *biofilms* prodotti da diverse specie batteriche, rivelando al tempo stesso un efficace effetto disgregante nei confronti di *biofilms* già consolidati [16]. Le evidenze circa il ruolo dei *biofilms* nella patogenesi di diverse patologie di interesse ORL sono in continuo incremento. La formazione di *biofilms* è stata, infatti, dimostrata per numerosi patogeni coinvolti in tali affezioni, quali PSA, SA, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Moraxella catarrhalis* [34]. La presenza di *biofilms* è stata, inoltre, spesso evidenziata nel materiale bioptico ottenuto da tessuto tonsillare, adenoideo, etmoidale e mascellare di pazienti affetti da infezioni ricorrenti delle alte vie respiratorie, mentre le otiti medie croniche e le forme essudative persistenti a carico dell'orecchio medio vengono sempre più frequentemente ascritte alla presenza di *biofilms* batterici [35]. Se nell'adulto le forme infiammatorie e/o infettive croniche-recidivanti delle alte vie respiratorie dimostrano ormai sempre più spesso un'eziopatogenesi rapportata alla presenza di *biofilms* batterici, che possono nel tempo coinvolgere anche le vie respiratorie inferiori, la presenza di *biofilms* è stata altresì di recente dimostrata nel rinofaringe del 95% di bambini affetti da infezioni ricorrenti delle vie aeree superiori [36]. Le conoscenze sulla complessa organizzazione dei *biofilms* hanno, inoltre, aperto nuove prospettive nel percorso di comprensione della refrattarietà alla terapia antibiotica spesso presente nelle otiti medie croniche.

In uno studio sperimentale su modello animale è stata indotta un'otite media purulenta cronica da PSA rilevando con la microscopia elettronica specifici *biofilms* di questo microrganismo solo in presenza di infezione da esso sostenuta [37]. L'analisi di materiale ottenuto da colesteatomi ha altresì evidenziato *biofilms* di PSA aderenti ai cheratinociti, contenenti geni in grado di codificare l'espressione di *quorum sensing* [34]. A conferma di ciò, i batteri usualmente isolati da colesteatomi indotti sperimentalmente si sono tra l'altro dimostrati in grado di formare *biofilms*, mentre al tempo stesso la matrice di cheratina del colesteatoma si è dimostrata un supporto ideale per la formazione di *biofilms* indotti da PSA, a conferma che la frequente persistenza e ricorrenza dell'otite media cronica colesteatomatosa, così come l'elevata efficacia del trattamento chirurgico, rappresentano tutti aspetti clinici coerenti con un possibile intervento eziopatogenetico della malattia ascrivibile alla presenza di *biofilms* [38, 39]. La rinosinusite cronica rappresenta, però, forse il più caratteristico quadro clinico ascrivibile alla presenza di *biofilms*, che si conferma anche a seguito di studi clinici e su modelli animali, laddove si è riprodotta un'infezione sperimentale dei seni paranasali con PSA, evidenziando i relativi *biofilms* con la microscopia elettronica a scansione [40-43]. Se la rinosinusite cronica è più spesso sostenuta da *H. influenzae*, è stata evidenziata una significativa correlazione tra la tendenza a formare *bio-*

films da parte di PSA e SA e la probabilità di persistenza della rinosinusite cronica, anche a seguito di intervento chirurgico [44]. Infine, la recente identificazione di *biofilms* sul 94,9% della superficie adenoidea in bambini affetti da rinosinusite e/o otite cronica rispetto all'1,9% della superficie in bambini operati di adenoidectomia per apnee ostruttive induce a correlare l'efficacia dell'intervento di rimozione chirurgica della tonsilla faringea con l'eliminazione di fatto del substrato sul quale aderiscono i *biofilms* batterici [36]. *Biofilms* prodotti da batteri Gram-positivi e Gram-negativi sono stati rilevati in 11/15 tonsille infette e in 3/4 tonsille asportate per ipertrofia. Questo dato ha trovato conferma anche in lavori più recenti [45, 46] dai quali è emersa la presenza di *biofilms* nella maggior parte dei casi di tonsillite cronica o ricorrente. In particolare, Kania et al. hanno evidenziato la presenza di *biofilms* nel 70,8% delle tonsille asportate chirurgicamente [45]. Con queste premesse, è facile dedurre quanto i *biofilms* "pesino" nella patogenesi delle patologie croniche/recidivanti del distretto rinosinusale e di tutte le prime vie respiratorie. In questo specifico ambito l'approccio terapeutico si è da sempre avvalso della via inalatoria, in quanto consente di raggiungere direttamente i siti interessati dalla patologia con dosaggi minimali rapportati all'elevata concentrazione raggiungibile in loco, nettamente superiori a quelli ottenibili per via sistemica, ma con minori effetti collaterali. Proprio nel contesto di specifica rilevanza di questo ambito terapeutico, unitamente alla sempre più estesa ricerca di nuovi principi attivi, anche naturali e complementari, in grado di intervenire efficacemente sulla formazione di *biofilms* e sulla loro degradazione, in considerazione della sempre più ridotta disponibilità di nuove molecole di sintesi con attività antimicrobica in grado anche di penetrare efficacemente queste complesse strutture, si è perciò inteso sperimentare due oli essenziali, diffusamente utilizzati per via inalatoria nella tradizione fitoterapica per la loro spiccata attività mucolitica. Lo scopo è stato quello di valutare se, alle concentrazioni di ES e JC tradizionalmente utilizzate in aerosolterapia (da 5 a 20 microl/mL, 0,5-2%), fosse effettivamente possibile influire sui *biofilms* prodotti da due microrganismi, quali PSA e SA, così spesso implicati nell'eziopatogenesi delle patologie croniche/recidivanti delle alte vie respiratorie, e in particolare nella patologie di pertinenza ORL. E ciò per dare forza e un razionale alla consolidata esperienza clinica fitoterapica che ha ormai da tempo messo in evidenza la notevole efficacia di questi due oo.ee., con le caratteristiche chimiche di Farmacopea che sono state oggetto anche della presente sperimentazione, nel contribuire a risolvere le forme croniche e recidivanti a carico del distretto ORL. I risultati ottenuti sperimentalmente *in vitro*, riassunti nelle Tabelle 1 e 2, hanno dimostrato l'estrema efficacia dei due oo.ee. sia nella fase di inibizione, sia nella fase di degradazione di *biofilms* già consolidati. L'attività si è manifestata sia su ceppi batterici ATCC di controllo, che su ceppi selvaggi con maggiore capacità di produrre *slime*, anche se (come atteso) l'efficacia si è dimostrata maggiore sui ceppi di controllo, mentre non sembrano sussistere significative differenze nell'attività dei due oli essenziali nei confronti di PSA e SA. Tale risultato è particolarmente rilevante, in quanto non solo dimostra l'elevata efficacia dei due fitoderivati, dimostratisi attivi anche su MRSA, ma sembra giustificarne un razionale utilizzo indipendentemente dall'agente eziologico implicato nella genesi del *biofilms* e della patologia sottesa. Per quanto concerne l'attività di inibizione dimostrata dai due fitoderivati (Tabella 1), prendendo in considerazione i risultati ottenuti sui due ceppi selvaggi (in considerazione della maggiore attività dimostrata sui ceppi ATCC), è evidente che già a concentrazioni dell'1% ES inibisce il 47,2% del *biofilm* prodotto da MRSA e il 40,8% del *biofilm* riferibile a PSA, mentre JC ha un'azione un po' più limitata. Peraltro, a concentrazioni pari al 2%, entrambi gli oli essenziali dimostrano un'efficacia ragguardevole. I risultati ottenuti aprono perciò nuove interessanti prospettive, che richiederanno ulteriori approfondimenti *in vitro* e *in vivo*, in grado di valutare con maggiore precisione il grado di efficacia nel contribuire a risolvere le patologie respiratorie riferibili a *biofilms* batterici, o la capacità di favorire con la loro azione quella di altri farmaci di sintesi con azione antibatterica specifica, che possono così essere messi in grado di penetrare con più efficacia la barriera del *biofilm*. Considerati i rilevanti risultati ottenuti, si è inoltre già avviato un analogo modello sperimentale per la valutazione dell'attività dei due oo.ee. utilizzati anche in associazione sinergica.

Keywords: essential oils, biofilms, upper respiratory tract infections.

RIASSUNTO

Staphylococcus aureus e *Pseudomonas aeruginosa* sono microrganismi con un riconosciuto ruolo nello sviluppo di *biofilms* resistenti all'azione di agenti antimicrobici. Gli oli essenziali di *Eucalyptus smithii* e *Juniperus communis* posseggono nella tradizione una serie di proprietà terapeutiche, tra cui l'attività mucolitica. In considerazione dell'importanza della formazione di *biofilms* come fattore di virulenza e patogenicità di *S. aureus* e *P. aeruginosa*, in questo studio si è inteso valutare se gli oli essenziali di *E. smithii* e *J. communis* fossero in grado di interferire con la formazione di *biofilms* prodotti da questi due microrganismi e potessero essere attivi anche su *biofilms* già maturi. I test eseguiti su ceppi di origine clinica di *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ceppi ATCC di *S. aureus* (ATCC 25923) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) hanno dimostrato che sia l'olio essenziale di *E. smithii* che quello di *J. communis* sono in grado di interferire sia con la fase di formazione del *biofilm*, sia con il *biofilm* già maturo. I risultati di questa valutazione aprono importanti prospettive per quanto riguarda il trattamento complementare per via inalatoria delle patologie croniche e /o ricorrenti delle alte vie respiratorie.

SUMMARY

Staphylococcus aureus *and* Pseudomonas aeruginosa *have a high propensity to develop biofilms that are resistant to antimicrobial agents.* Eucalyptus smithii *and* Juniperus communis *essential oils are credited with a series of traditional therapeutical properties, including mucolytic effect. As* S. aureus *and* P. aeruginosa *biofilms are known to be important factors underlying their virulence and pathogenicity, the aim of this study was to investigate whether* E. smithii *and* J. communis *essential oils can interfere with biofilm formation as well as acting on mature biofilms. Tests of two* S. aureus *and* P. aeruginosa *clinical strains and two ATCC strains (*S. aureus *ATCC 25923 and* P. aeruginosa *ATCC 27853) showed that both* E. smithii *and* J. communis *essential oils interfere with the starting phases of biofilm production, as well as with mature biofilms. The results of this study reveal new relevant perspectives for a complementary inhalatory treatment of chronic and/or recurrent upper respiratory tract infections.*

BIBLIOGRAFIA

[1] Bellussi L.M., De Benedetto M., Lauriello M., Passali D. I biofilm batterici nella patologia cronica di competenza ORL. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 2, 1-11, 2008.
[2] Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193, 2002.
[3] Drago L. Batteri e biofilm nelle infezioni respiratorie. *Infezioni in Medicina*. (Suppl. 2), 3-9, 2009.
[4] Camporese A. L'impatto dei recenti progressi delle tecniche molecolari nella diagnosi delle infezioni delle basse vie respiratorie (LRTI). *Infezioni in Medicina* 4, 237-244, 2012.
[5] Legnani D. Riacutizzazione di bronchite cronica e biofilm. *Infezioni in Medicina* Suppl. 2, 10-19, 2009.
[6] Dunne W.M. Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155-166, 2002.
[7] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Rev. Drug. Discov.* 2, 114-122, 2003.
[8] Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322, 1999.
[9] Spoering A.L., Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol*. 183, 6746-6751, 2001.
[10] Stewart P.S., Costerton J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-138, 2003.
[11] Bell M. Biofilms: a clinical perspective. *Curr. Infec. Dis. Rep.* 3, 483-86, 2001.
[12] Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 194-222, 2002.
[13] Schulin T., Voss A. Coagulase-negative staphylococci as a cause of infections related to intravascular prosthe- tic devices: limitations of present therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (Suppl. 4), 1-7, 2001.
[14] Peters G., Locci R., Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surface of intravenous catheters. *J. Infect. Dis.* 146, 479-482, 1982.
[15] Hounay B.H., Parisi J.T. *Staphylococcus epidermidis*: a significant nosocomial pathogen. *Am. J. Infect. Control* 15, 59-74, 1987.
[16] Bozzolasco M., Debbia E.A., Schito A.M. Rilevanza dei biofilm batterici nelle infezioni respiratorie: problematiche terapeutiche e possibili soluzioni. *GIMMOC* VI (3), 203-215, 2002.

[17] Camporese A. Essential oils and antimicrobial therapy. *Leader for Chemist* VII (1), 4-13, 1997.
[18] Camporese A. Oli essenziali e malattie infettive. Tecniche Nuove Ed. 1998, Milano.
[19] Camporese A. Salute e benessere con gli oli essenziali. Tecniche Nuove Ed. 2003, Milano.
[20] EDQM-European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. The European Pharmacopoeia, 7th Edition. http://pharmeuropa.edqm.eu. Last accessed 10 Gennaio 2013.
[21] Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42, 872-874, 1989.
[22] Zmantar T., Chaieb K., Miladi H., et al.. Detection of the intercellular adhesion loci (*ica*) in clinical *Staphylococcus aureus* strains responsible for hospital acquired auricular infection. *Ann. Microbiol.* 56, 349-352, 2006.
[23] Snoussi M., Chaieb K., Rouabhia M., Bakhrouf A. Quantitative study, identification and antibiotics sensitivity of some Vibrionaceae associated to a marine fish hatchery. *Ann. Microbiol.* 56 (4), 289-293, 2006.
[24] Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., et al. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials* 23, 4233-4239, 2002.
[25] Niebuhr W., Krimmer V., Rachid S. A novel mechanism of phase variation of virulence in Staphylococcus epidermidis: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* 32, 345-335, 1999.
[26] Cramton S.E., Gerke C., Catz F. In vitro methods to study biofilm formation. In: Methods in enzymology 336, 239-255, 2001.
[27] Carsenti-Etesse H., Durant J., Entenza J., et al. Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin and teicoplanin on adherence of staphilococci to tissue culture plates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 921-923, 1993.
[28] Gilbert P., Das J., Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160-167, 1997.
[29] Amorena B., Gracia E., Monzón M., et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J. Ant. Chemother.* 44, 43-55, 1999.
[30] Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (mar) and the potential of the multidrug efflux pump acrAB to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 789-795, 2000.
[31] Farber B.F., Wolf A.G. The use of nonsteroidal antiinfiammatory drugs to prevent adherence of *Staphylococcus epidermidis* to medical polymers. *J. Infect. Dis.*166, 861-865, 1992.
[32] Pérez-Giraldo C., Rodrìguez-Benito A., Moràn F.J., Hurtado C., Blanco M.T., Gomez-Garcia A.C. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chem.* 39, 643-646, 1997.
[33] Ren D., Sims J.J., Wood T.K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol.* 3 (11), 731-736, 2001.
[34] Post J.C., Hiller N.L., Nistico L., Stoodley P., Ehrlich G.D. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 15, 347-351, 2007.
[35] Zuliani G., Carron M., Gurrola J. Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* 18, 377-380, 2004.
[36] Coticchia J., Zuliani G., Coleman C. Biofilm surface area in the pediatric nasopharynx: Chronic rhinosinusitis vs obstructive sleep apnea. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 133, 110-114, 2007.
[37] Dohar J.E., Hebda P.A., Veeh R., Awad M., Costerton J.W., Hayes J. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in a non human primate model of chronic suppurative otitis media. *Laryngoscope* 8, 1469-1472, 2005.
[38] Chole R.A., Faddis B.T. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 128, 1129-1133, 2002.
[39] Wang E.W., Jung J.Y., Pashia M.E. Otopathogenic Pseudomonas aeruginosa strains as competent biofilm formers. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 131, 983-989, 2005.
[40] Palmer J. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 196, 35-39, 2006.
[41] Ramadan H.H., Sanclement J.A., Thomas J.C. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 132, 414-417, 2005.
[42] Ferguson B.J., Stolz D.B. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* (Suppl.) 19, 452-457, 2005.
[43] Almer J. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* (Suppl.) 196, 35-39, 2006.
[44] Bendouah Z., Barbeau J., Hamad W.A., Desrosiers M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 134, 991-996, 2006.
[45] Kania R.E., Lamers G.E., Vonk M.J. Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 133, 115-121, 2007.
[46] Galli J., Ardito F., Calò L., et al. Recurrent upper airway infections and bacterial biofilms. *J. Laryngol. Otol.* 121, 341-344, 2007.